

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792230

研究課題名(和文) シェーグレン症候群の病態形成・進展のメカニズムの解析－Thサブセットの関与－

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of the condition of a patient formation, the progress of Sjogren's syndrome

研究代表者

田中 昭彦 (TANAKA, AKIHIKO)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：70615799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシェーグレン症候群の病変局所における病態について解析することを目的とした。同一患者間での病変局所におけるThサブセットの局在について、健常者との比較およびSSのリンパ球の浸潤程度間において検討を行った。

本研究によりSSの導管上皮周囲に浸潤したTh1とTh17両者が、病態進展ではなくその発症に重要な役割を担っていることが強く示唆された。さらに、Th1およびTh17に加えて、Th2およびTfhが集積してくることで、病態が進展し、特にGCの形成には、Th2とTfhが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was intended to analyze it about the condition of the patient in the lesion local site of Sjogren's syndrome in this study. I examined the local existence of the Th subset in the lesion local site between the same patients between the permeation degree of the lymphocyte of the comparison with the physically unimpaired person and the SS.

It was strong to carry the role that was important to the onset not condition of the patient progress, and both Th1 and Th17 where it permeated around the ductal epithelium of the SS were suggested by this study. Furthermore, in addition to Th1 and Th17, the condition of the patient progressed in what Th2 and Tfh accumulated and it was particularly strong that Th2 and Tfh played an important role for the formation of the GC and was suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Thサブセット サイトカイン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

SSは、唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患であり、ドライマウス(口腔乾燥)やドライアイ(乾燥性角結膜炎)を主症状とする。導管上皮へのリンパ球浸潤を特徴とし、病態進展とともに高グロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することがあるため、リンパ増殖性病変とも称される。また、シェーグレン症候群(SS)では唾液腺の病変局所において、唾液腺導管周囲にリンパ球が浸潤するだけでなく、病態進展とともに胚中心(GC)を形成することがある。

最近、Theanderら(Ann.Rheum.Dis.2011,70;1363-68)は、SSの口唇腺におけるGC形成が悪性リンパ腫の発症に関連すると報告した。

またわれわれは以前より、SSの唾液腺に浸潤するヘルパーT細胞(Th)細胞に注目し、予備実験では唾液腺で発現されるサイトカインとTh細胞の選択的遊走に關与するケモカイン、ケモカインレセプター発現のパターンから、SSの唾液腺病変の発症にはTh1とTh17が重要であり、病態進展にはTh2が重要であることを報告してきた。

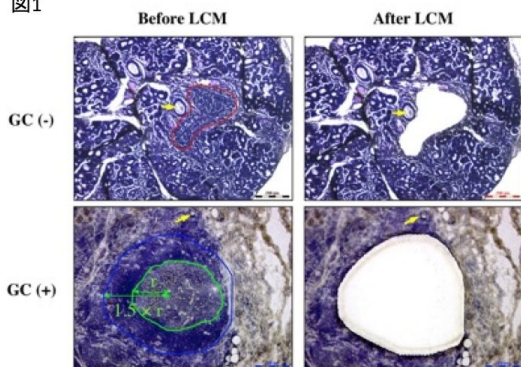
2. 研究の目的

SSの発症や病態進展については不明な点が多いが、最近の研究では、唾液腺などの病変局所におけるGCの形成が悪性リンパ腫への病態進展の最初のステップであることが報告されている。われわれは以前より、唾液腺に浸潤するThに注目してきたが、前向きコホート研究でも経時的な分析ではないためにSSの発症や病態進展について適正に評価することは困難であった。そこで、本研究ではLaser Capture Microdissection(LCM)を用いて、同一患者間での病変局所におけるThサブセットの局在について解析を行い、SSの病態進展のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SSの口唇腺(LSG)局所におけるThサブセットの局在についての解析(LCM法+Real time PCR法、免疫組織化学染色)

図1



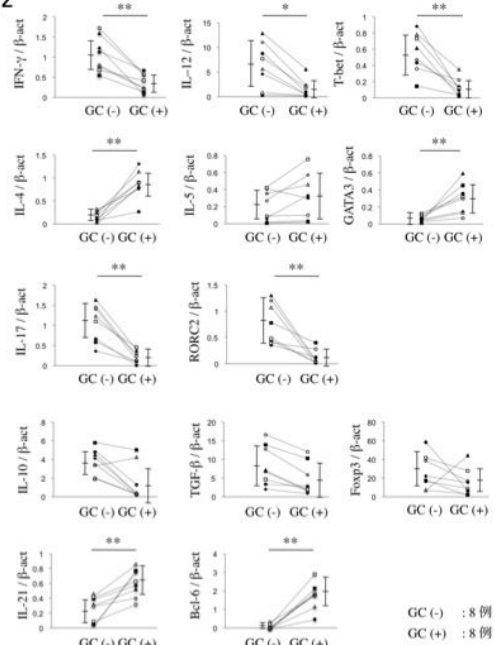
(2) SSの新しい診断方法の確立(フローサイトメトリー、ELISA)

SSの診断には多くの検査を要するのが現状であり、特に口唇腺生検は侵襲的で繰り返し行うことは困難であることから、それに代わるものが望まれている。最近では、非侵襲的で簡便な検査法として、唾液を用いた検査法がAIDSや前立腺癌などで考案されている(Clin Cancer Res 2006;12:5033-9.)。また、SS患者の口唇腺におけるサイトカインのmRNA発現と唾液中のサイトカイン濃度は相関することが報告されている(J Immunol 1994;152:5532-9.)。そこで本研究では、新しい診断方法の試みとして、可溶性分子であるサイトカインとケモカインの唾液中濃度を解析し、その有用性を検討する。唾液中のこれらの分子の濃度測定は、第1選択としては、フローサイトメトリーによる方法を、フローサイトメトリーによる測定が不可能であった分子については、ELISAを用いて検査を行う。

4. 研究成果

(1) SSのLSGでは健常者と比較して、全てのThサブセット関連分子の発現が亢進していた。また、SS患者をリンパ球の浸潤程度で軽度と重度の2群に分けて比較したところ、重度ではTh2関連分子(IL-4、GATA3)およびTfh関連分子(Bcl-6)の発現が亢進していた。次に病態進展のメカニズムを解析するために、同一患者での導管周囲の病変局所とGC形成部におけるThサブセットの発現を比較検討した。新鮮凍結切片において導管周囲に浸潤しているリンパ球をGC(-)とし、GCおよびGC周囲のリンパ球をGC(+)として、それぞれLCMを用いて分離採取した(図1)。同一患者でのGC(-)とGC(+)の2群においてreal-time PCR法を用いて、Thサブセット関

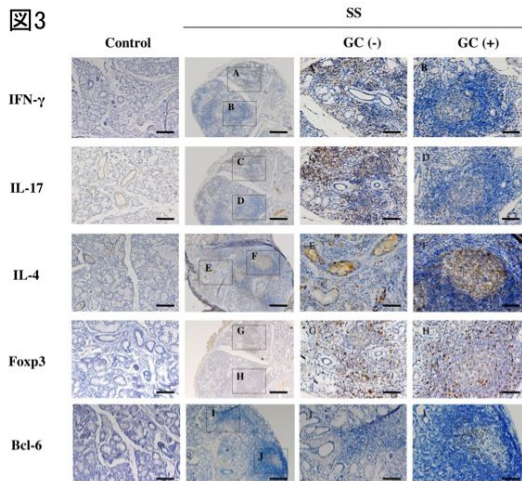
図2



GC(-) : 8例  
GC(+) : 8例

連分子の mRNA 発現を検討した。その結果、Th1 関連分子(IFN- $\gamma$ 、IL-12、T-bet)および Th17 関連分子(IL-17、RORC2)の発現は、GC (-)で亢進していた。一方、Th2 関連分子(IL-4、GATA3)および Tfh 関連分子(IL-21、Bcl-6)の発現は GC (+)で亢進していた。Treg 関連分子については、両群間で有意な差は認めなかった(図 2)。免疫組織化学染色でも同様に、IFN- $\gamma$  および IL-17 は、GC (-)に強い発現を認めた。一方、IL-4 および Bcl-6 は GC(+)で強い発現を認めた。また Foxp3 の発現は、両群間で明らかな差は認められなかった(図 3)。

図3



SSの唾液腺ではThサブセットの局在が認められ、Th1 および Th17 が導管周囲に集積することでSSの発症に関与し、Th2 および Tfh が集積することで、病態の進展、特に GC の形成に関与していることが示唆された。

(2) 特に B 細胞の分化・活性を促す Th2 が SS の病態進展に重要な役割を果たしていることに注目しさらなる検討を行った。最近では、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患において新しく同定されたサイトカインである IL-33 が、IL-33 の受容体である ST2 を発現している Th2 に作用し、細胞の活性化と Th2 サイトカイン産生を誘導することが報告されている。そこで今回われわれは、SSの病態進展と IL-33 との関連について検討を行った。SS 患者では健常者と比較して、IL-4、IL-33、ST2 のいずれの分子についても mRNA 発現の亢進を認めた。さらに、IL-4 と IL-33 においては、SS 患者のリンパ球浸潤程度と正の相関を認めた(図 4)。免疫組織化学染色では、健常者では IL-4、ST2 の発現はほとんど認められず、IL-33 も導管上皮のみに弱い発現を認めた。一方 SS 患者では、リンパ球の浸潤程度が重度の症例は軽度の症例と比較して、IL-4 と IL-33 は導管上皮とその周囲に強い発現を認め、ST2 も多くの浸潤リンパ球に発現を認めた(図 5)。

図4

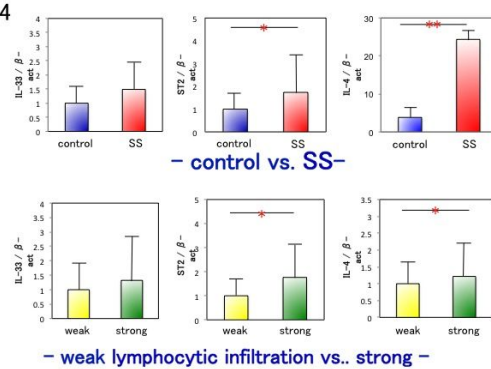
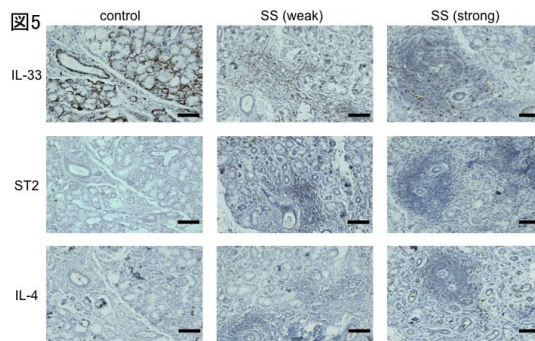


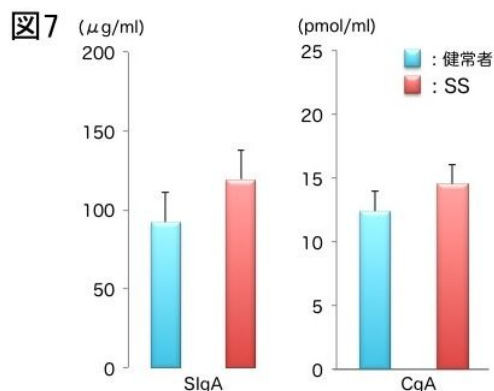
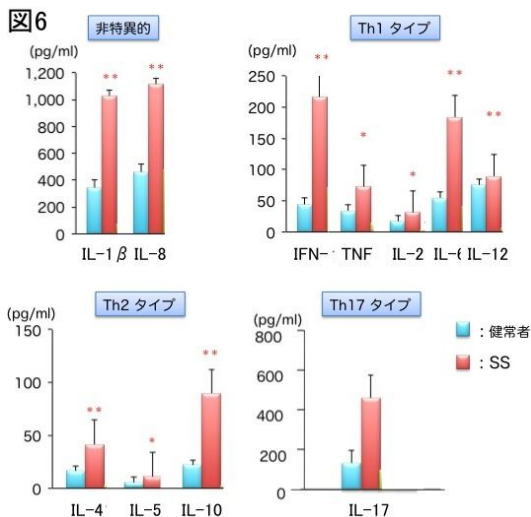
図5



以上の研究により、SS の唾液腺局所において、特に GC (-)と GC (+)において、Th サブセット(Th1、Th2、Th17、Tfh)の局在があった。このことから SS の発症および病態進展のメカニズムを考えると、その唾液腺病変初期には、Th1 と Th17 が導管上皮周囲へ集積し、それに加えて Th2 と Tfh が集積することで、病態が進展し特に GC の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。Th 細胞相互の SS への関与については更なる解析が必要であるが、さらに研究が進めば、病態進展の抑制に有効な治療戦略に繋がるのではないかと考えている。また、SS の複雑な因果関係がさらに解明されれば、病態進展に関わる特異的なサイトカインネットワークを遮断する薬物を用いた発症や病態進展の抑制のための治療法が確立するかもしれない。

(3) SS の診断基準の検査項目の中には煩雑で、検査出来る施設が限られている画像検査や、口唇腺生検など侵襲性が高く、繰り返し行えない検査も含まれている。そこで、本研究では簡便で侵襲性が低く、かつ繰り返し採取可能な唾液を検体とした SS の新たな診断方法の確立を目指した。サイトカインについては、フローサイトメトリーにて解析を行った。健常者と比較して、SS では、IL-17 以外のすべてのサイトカインの濃度が有意に高値であった(図 6)。また、ドライマウスとの関連が報告されているストレス関連物質である SIgA と CgA について ELISA を用いて検討したところ、SIgA 濃度については高値であったものの、健常者との比較では有意差は認めなかった。CgA 濃度については、健常者との比で有意に高い濃度を示した(図 7)。以上

の結果から、唾液中のサイトカイン濃度測定は SS の病態を把握するモニター、診断のツールとして有用であることが示唆された。



(4) さらに、SS との類似疾患として注目されている Mikulicz 's 病(MD)に着目した。MD は唾液腺へのリンパ球浸潤、唾液腺の腫脹といった症状が SS と類似していることから類似疾患とされていたが、MD では血清 IgG4 値の高値と唾液腺への IgG4 陽性形質細胞浸潤という明らかに SS とは異なった所見を認めることが明らかになり、さらに同様の所見が肺、膵臓、腎臓と全身諸臓器に認められ IgG4 関連疾患という新たな疾患概念が提言された。SS との病理組織学的な比較検討はすでに報告があるが、病態については明らかにはなっていないため、病態解明を目的に SS と同様の検討を行った。LSG におけるサイトカインの発現について MD では SS とことなり Th2、T-reg タイプのサイトカインの発現が著明であった。特に、IgG4 産生と IL-4(Th2)、IL-10(T-reg)との間に関連を認めた。今回の結果から、MD では Th2 が病態に深く関与していることが示唆された。今後は Th2 と関連分子 (IL-33 など) について更に検討を行っていく予定である。また、IgG4 関連疾患のもう一つの特徴でもある繊維化についても検討を行う予定である。さらに、MD の治療にはス

テロイドが有効とされているが根治的な治療には至っていない。今後はさらに解析を進めることで標的分子を特定し、治療ターゲットとして利用出来る可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Maehara T, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, Shinozaki S, Matsumura K, Kubo Y, and Nakamura S., Selective localization of Th subsets in labial salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients., *Clin Exp Immunol*, 査読有り、169(2)、2012、89-99.

Moriyama M, Hayashida J-N, Toyoshima T, Ohyama Y, Shinozaki S, Tanaka A, Maehara T, Nakamura S., Cytokine/chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome., *Clin Exp Immunol*, 査読有り、169(1)、2012、17-26.

Maehara T, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, Shinozaki S, Matsumura K, Kubo Y, and Nakamura S., Interleukin-21 contributes to germinal centre formation and immunoglobulin G4 production in Mikulicz's disease., *Ann Rheum Dis*, 査読有り、71(12)、2012、2011-20.

Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Ohyama Y, Shimizu M, Nakashima H, Hayashida JN, Shinozaki S, Kubo Y, Furukawa S, Kikuta T, Nakamura S., Clinical characteristics of Mikulicz's disease as an IgG4-related disease., 査読有り、*Clin Oral Investig.*, doi: 10.1007/s00784-012-0905-z

Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, and Nakamura S., T helper subsets in Sjögren syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review., *J Autoimmun.* 査読有り、Aug 3. pii: S0896-8411(13)00103-0、2013.

〔学会発表〕(計 8 件)

森山雅文, 林田淳之將, 田中昭彦, 他、ミクリツ病/IgG4 関連疾患の臨床的検討、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012.10.18-20、神奈川県

田中昭彦, 森山雅文, 他、ミクリツ病/IgG4 関連疾患の IgG4 産生におけるサイトカイン・ケモカインの関与、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012.10.18-20、神奈川県

前原 隆, 森山雅文, 林田淳之將, 田中昭彦, 他、ミクリツ病/IgG4 関連疾患の胚中心過形成における IL-21 の関与、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012.10.18-20、神奈川県

前原 隆, 森山雅文, 林田淳之將, 田中昭彦, 他、ミクリツ病/IgG4 関連疾患の胚中心過形成における IL-21 の関与、第 21 回日本シェーグレン症候群学会、2012.9.7-8、京都府

Maehara T, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, 他、Interleukin-21 Contributes To Germinal Center Formation And Igg4 Production In Mikulicz's Disease.、10th Asian Association of Oral and Maxillofacial Surgeons、2012.11.15-18、インドネシア

Furukawa F, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, Maehara T, 他、IL-33 cotributes to the pathogenesis of Sjögren syndrome.、第 60 回 JADR 総会・学術大会、2012.12.14-15、新潟県

古川 祥子、森山 雅文、田中 昭彦、他、IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の病態形成における M2 マクロファージの関与、第 22 回日本シェーグレン症候群学会、2013.9.13、大阪府

Furukawa F, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, Maehara T, 他、Polarized M2 macrophages promote fibrosis of glandular tissue in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis (IgG4-DS). 、12th International Symposium on Sjögren's Syndrome、2013.10.11、京都

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田中 昭彦 (TANAKA Akihiko)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号 : 70615799